

THÀNH PHẦN HYDROCARBON TRONG BỘ PHẬN HOA CỦA CÂY THÔNG SCOTS (*Pinus sylvestris*)

ĐÀO NGUYỄN MẠNH ⁽¹⁾, TRẦN THANH TUẤN ⁽¹⁾, QUÁCH THỊ QUỲNH ⁽¹⁾,
NGUYỄN THỊ THU THỦY ⁽¹⁾, VŨ THỊ LOAN ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông Scots (*Pinus sylvestris*) là loài thực vật phổ biến nhất của chi Thông, chiếm tới 1/6 diện tích rừng và là nguồn khai thác gỗ chính của Nga. Bên cạnh nguồn lợi về gỗ, thông Scots còn có nhiều giá trị trong y học như lá thông được sử dụng để bào chế chế phẩm Ropren hỗ trợ điều trị viêm gan và suy giảm trí nhớ; tinh dầu thông được dùng để chống oxy hóa, kháng khuẩn, hỗ trợ điều trị rối loạn mỡ máu và phòng ngừa các bệnh về tim mạch [1]; nhựa thông hóa thạch (hồ phách) được sử dụng để sản xuất các thiết bị y tế; ngoài ra còn có một số thực phẩm chức năng và sản phẩm khác được bào chế từ các bộ phận của cây thông như: thực phẩm chức năng Pinabin, Phitolizin, kem đánh răng...[1, 2].

Đã có nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học trong các bộ phận cây thông Scots, tuy nhiên bộ phận hoa đến nay vẫn chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ, đặc biệt là các dữ liệu về thành phần hóa học. Nghiên cứu thành phần nhóm chất terpenoid trong bộ phận hoa của cây thông Scots là cơ sở dữ liệu khoa học làm nền tảng cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân tích thành phần hydrocarbon trong nhóm chất terpenoid được chiết tách từ bộ phận hoa của cây thông Scots [1], [2].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là bộ phận hoa của cây thông Scots (*Pinus sylvestris*) bao gồm hoa đực (HĐ) và hoa cái (HC) được thu hái tại khu vực phía bắc thành phố Xanh Petecbua, Liên bang Nga. Thời gian thu hái từ tháng 4 đến tháng 5, thời gian xuất hiện của hoa kéo dài 1-2 tháng, trong đó thời điểm thu hái phù hợp nhất là trong tuần cuối tháng 4 hoặc đầu tháng 5.

Hoa đực thường mọc thành cụm ở đầu cành, có hình bầu dục với màu vàng tươi, đường kính từ 1-1,5 cm, bao gồm trục nón chính giữa và các túi phấn hình vẩy bao quanh. Hoa cái gồm một trục lớn ở giữa và các vẩy chứa noãn ở xung quanh, noãn được thụ tinh nhờ gió, sinh sản bằng hạt nằm lộ trên lá noãn (hình 1).



Hình 1. Hoa đực (A) và hoa cái (B) của cây thông Scots (*Pinus sylvestris*)

2.2. Dụng cụ hóa chất dùng trong nghiên cứu

- Thiết bị dùng trong nghiên cứu: Thiết bị chiết Soxhlet (Trung Quốc); thiết bị cất quay chân không (Buchi, Thụy Sĩ); cân phân tích (Ohaus, Mỹ): $210\text{g} \pm 0,001\text{g}$; cân kỹ thuật (Ohaus, Mỹ): $1000\text{g} \pm 0,001\text{g}$; cột sắc ký thủy tinh (Iwaki, Nhật bản): đường kính 20 mm, chiều dài 400 mm; đèn UV soi bản mỏng (Trung Quốc); thiết bị sắc ký khí ghép khối phổ Agilent 5973 (Agilent, Mỹ); bản mỏng TLC 60 RP-18 F₂₅₄S (Sigma, Mỹ).

- Hóa chất, vật tư dùng trong nghiên cứu: Isopropanol (Merck, Đức); petroleum ether (Merck, Đức); diethyl ether (Merck, Đức); ethyl acetat (Merck, Đức); Na₂SO₄ khan (Merck, Đức); H₂SO₄ đậm đặc (Merck, Đức); NaOH (Merck, Đức); KOH dạng rắn (Merck, Đức); iod tinh thể (Merck, Đức); bột silicagel cỡ hạt 0,04-0,063 mm (Merck, Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp xác định độ ẩm

Hoa sau khi thu hái được nghiền nhỏ sau đó tiến hành đo độ ẩm. Cân 2-5 g bột hoa cho vào trong lọ thủy tinh có nắp đậy, xác định chính xác khối lượng bột hoa m_0 (độ chính xác đến 1 mg), mở nắp và đưa toàn bộ vào trong tủ sấy, sấy trong 3 giờ ở nhiệt độ 105°C. Sau đó tiến hành làm nguội, xác định khối lượng sau khi sấy và tiếp tục tiến hành sấy lần 2 trong 1 giờ, làm nguội xác định khối lượng m_1 . Độ ẩm được xác định theo công thức sau:

$$X = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100 \% \quad (1)$$

Trong đó: X là độ ẩm (%); m_0 là khối lượng ban đầu (g); m_1 là khối lượng sau khi sấy 2 lần (g).

- Phương pháp chiết Soxhlet

Cho 50 g bột hoa thông Scots vào bình chiết Soxhlet, có thể cho bột vào trong túi vải hoặc đặt một lớp bông thấm nhỏ ở dưới đáy ống xi-phông. Lắp ống chiết vào trong bình cầu thu hồi, sau đó đổ dung môi (isopropanol, diethyl ether, petroleum ether, ethyl acetat.) vào trong ống chiết sao cho lượng dung môi chảy qua ống xi-phông lấp đầy 2/3 bình cầu. Bình cầu thu hồi được đặt trong bếp đun điều nhiệt. Kiểm tra lại toàn bộ hệ thống chiết sau đó tiến hành đun ở nhiệt độ thích hợp trong vòng 8 giờ. Lọc dịch chiết thu được, cô quay loại bỏ dung môi và xác định khối lượng cần thu được (cao chiết IP) [3].

- Phương pháp chiết terpenoid tổng số từ cao chiết isopropanol (IP)

Thêm 250 ml petroleum ether (PE) vào trong bình cầu chứa cao chiết IP thu được, đun nóng (vừa đun vừa lắc) ở nhiệt độ 50°C trong vòng 30 phút dưới thiết bị ngưng tụ. Gạn, thu hồi dịch chiết PE, tiếp tục bổ sung 250 ml PE, đun nóng và gạn thu hồi dịch chiết PE. Quá trình được lặp lại 4 lần với cùng thể tích PE (250 ml). Gộp các dung dịch chiết PE, cất cô loại bỏ dung môi thu được cần PE (terpenoid tổng số).

- Phương pháp tách axit tự do và chất trung tính từ terpenoid tổng số

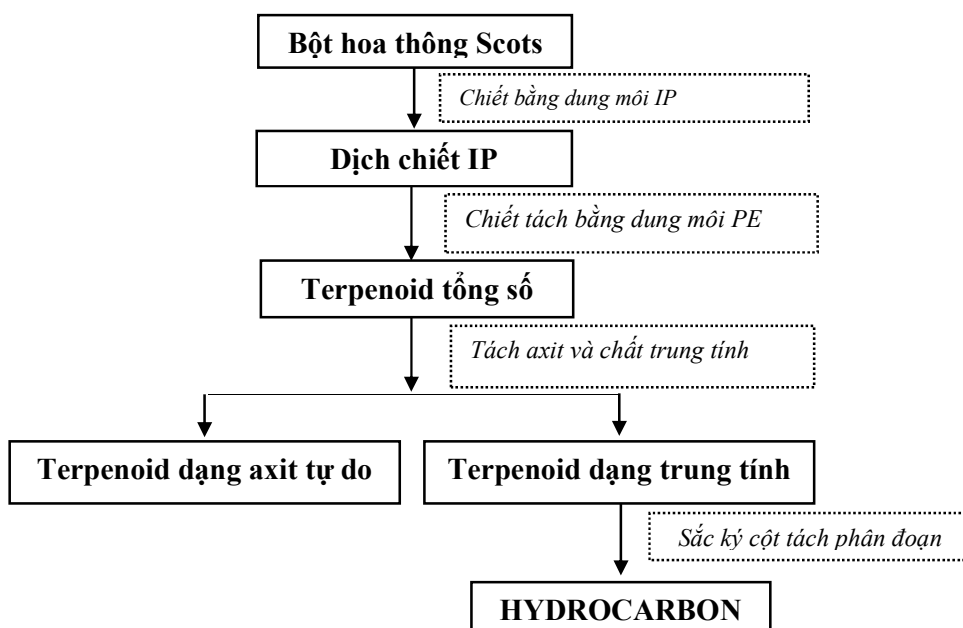
+ Hòa tan căn PE trong 250 ml diethyl ether (DE), sau đó đổ vào bình chiết quả lê (B1) chứa 20 ml nước cất; Kiểm hóa dung dịch bằng NaOH 3% cho đến khi pH của dung dịch >12; tiến hành lắc mạnh, để lắng cho đến khi dung dịch trong bình chiết phân thành 2 lớp rõ rệt (dung dịch DE ở lớp phía trên, dung dịch nước ở phía dưới).

Tách, thu hồi dung dịch DE ở lớp phía trên, rửa bằng nước cất cho đến khi pH=7,0 thì dừng lại. Tiếp tục chiết bằng dung môi DE (mỗi lần 250 ml) cho đến khi lớp DE trong bình B1 trong suốt thì dừng lại. Gộp các dịch chiết DE, loại nước bằng Na₂SO₄ khan, cất cô loại bỏ dung môi, thu được terpenoid dạng trung tính.

+ Dung dịch nước ở lớp dưới được trung hòa bằng dung dịch H₂SO₄ 5% cho đến khi pH = 7,0. Chiết bằng dung môi DE (mỗi lần 250 ml) cho đến khi lớp dung dịch DE trong suốt thì dừng lại. Các dịch chiết DE được gộp chung, loại bỏ nước bằng Na₂SO₄ khan, lọc, cất cô loại bỏ dung môi thu được terpenoid dạng axit tự do.

- Phương pháp sắc ký cột hở để tách, thu hồi hydrocarbon từ terpenoid dạng trung tính

Hydrocarbon được tách bằng phương pháp sắc ký cột hở với pha tĩnh là silicagel, pha động là n-hexan. Hòa tan silicagel với n-hexan sau đó đưa vào cột sao cho lớp silicagel cách mép trên của cột 10 cm. Thêm 2 g terpenoid dạng trung tính, tiến hành rửa giải bằng dung môi n-hexan. Sử dụng sắc ký bản mỏng với pha động là n-hexan để kiểm tra trong quá trình rửa giải. Vết terpenoid được kiểm tra bằng hơi iod trong dung môi DE. Hơi iod cho các vết màu nâu tím khi xuất hiện các vết của terpenoid [3].



Hình 3. Sơ đồ nghiên cứu

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả đo độ ẩm của bột hoa thông Scots

Độ ẩm của bột hoa thông Scots được đo 3 lần với khối lượng tương đương (bao gồm cả khối lượng của lọ thủy tinh). Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định độ ẩm của bột hoa thông Scots

STT	Khối lượng trước sấy (g)	Khối lượng sau khi sấy 3h (g)	Khối lượng sau sấy 4h (g)	Độ ẩm
Lần 1	16,5566	15,8966	15,8950	61,84%
Lần 2	16,4603	15,8943	15,8991	60,68%
Lần 3	15,9552	15,3635	15,3625	61,58%

Kết quả thu được cho thấy, độ ẩm trung bình của bột hoa thông Scots thu được là 61,36 %, độ ẩm tương đối cao so với các bộ phận khác của thông Scots như lá, vỏ (30-40%) [4].

3.2. Kết quả chiết tách hoạt chất bằng các dung môi khác nhau

Các nhóm hoạt chất trong hoa đực và hoa cái của thông Scots được chiết bằng phương pháp Soxhlet với các dung môi khác nhau: PE, DE, IP và ethyl acetat (EA). Kết quả hàm lượng hoạt chất được chiết tách so với bột khô thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng hoạt chất chiết được từ hoa thông Scots

Dung môi chiết	Hàm lượng hoạt chất/khối lượng bột khô (%)		
	Hoa đực	Hoa cái	Bộ phận lá
Petroleum ether (PE)	10,5	14,2	15,0
Diethyl ether (DE)	15,4	15,0	22,0
Ethyl acetat (EA)	32,9	19,2	26,8
Isopropanol (IP)	47,7	29,3	36,9

Từ kết quả trên cho thấy, các hoạt chất chiết được bằng dung môi PE, DE từ hoa đực, hoa cái và lá có hàm lượng tương đối đồng đều với nhau. Trong đó hàm lượng ở trong bộ phận lá chiếm tỷ lệ cao nhất (15,0% và 22,0%). Điều này chứng tỏ hàm lượng terpenoid có trong bộ phận lá [4] cao hơn tương đối so với bộ phận hoa. Ngược lại, hàm lượng hoạt chất được chiết bằng các dung môi có độ phân cực mạnh (EA, IP) ở bộ phận hoa cao hơn đáng kể so với ở lá, trong đó hoa đực chiếm tỷ lệ cao nhất (32,9 % và 47,7 %).

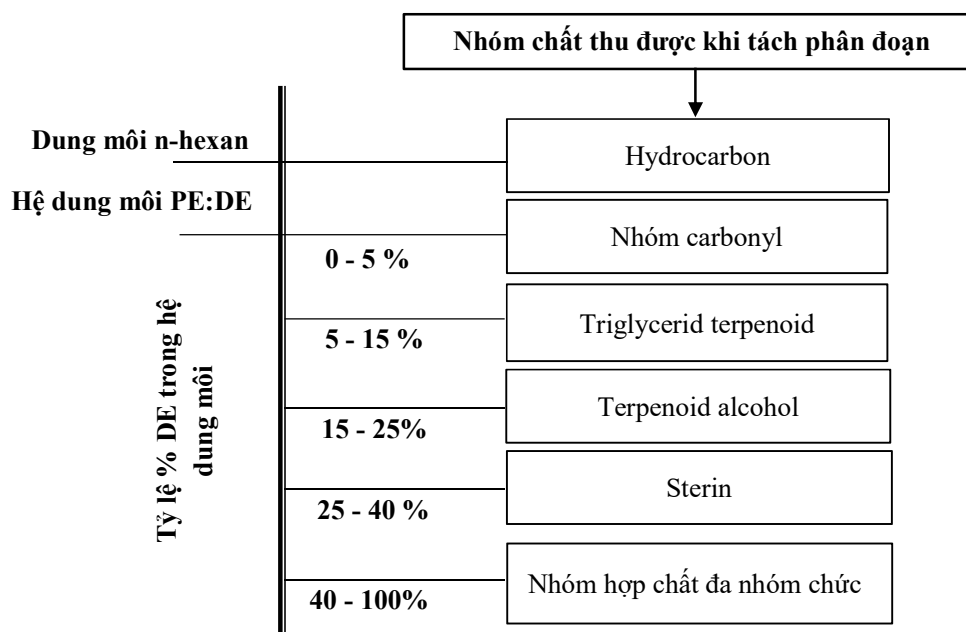
Từ dịch chiết IP thu được, tiến hành tách terpenoid tổng số bằng dung môi petroleum ether. Sau đó cất cô loại bỏ dung môi thu được tổng hàm lượng các chất tan trong PE ở hoa đực (36,22%) và hoa cái (64,22%). Từ căn PE thu được, tách terpenoid dạng axit tự do và chất trung tính bằng phương pháp axit-bazo. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng axit tự do và chất trung tính tách từ dịch chiết PE của hoa thông Scots

Nhóm chất	% so với khối lượng dịch chiết PE sau khi loại bỏ dung môi		
	Hoa đực	Hoa cái	Bộ phận lá
Axit tự do	49,7	59,9	52,0
Chất trung tính	44,9	37,5	44,5

Hàm lượng terpenoid dạng axit tự do và trung tính trong dịch chiết PE ở hoa đực và lá thông Scots có tỷ lệ tương đồng với nhau, sự khác biệt không quá lớn. Tuy nhiên, ở hoa cái, terpenoid dạng axit tự do có hàm lượng cao hơn rất nhiều so với dạng trung tính. Kết quả của nhóm tác giả khi phân tích thành phần hóa học của terpenoid dạng axit tự do bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC-MS sau khi metyl hóa thu được 11 axit tự do khác nhau có hàm lượng cao. Trong đó axit isopimaric và dehydroabietic chiếm tỷ lệ cao nhất trong hoa đực và hoa cái (27% và 30% tương ứng), còn axit abietic và pinifolic (13 và 29,7% tương ứng) là hai thành phần axit tự do chiếm tỷ lệ cao nhất trong lá thông [6].

Terpenoid dạng trung tính sau khi rửa giải bằng n-hexan, tiếp tục rửa giải bằng hệ dung môi PE:DE với tỷ lệ của PE và DE từ tương ứng từ 0-100 đến 100-0 (tỷ lệ % khối lượng) để thu được các nhóm hoạt chất còn lại trong terpenoid tổng số. Kết quả thu phân đoạn được trình bày ở hình 4.

**Hình 4.** Sơ đồ phân đoạn sắc ký tách terpenoid trung tính

Kết quả tách phân đoạn bằng dung môi n-hexan thu được nhóm hydrocarbon bao gồm alkan và terpen. Trong đó, hàm lượng hydrocarbon thu được ở hoa đực và hoa cái tương ứng là 1,48 % và 2,8% so với tổng khối lượng của terpenoid trung tính. Kết quả chạy rửa giải bằng hệ dung môi PE:DE với tỷ lệ của DE từ 0-100% thu được 5 nhóm hợp chất khác nhau, trong đó các terpenoid gốc rượu chiếm tỷ lệ cao nhất (hơn 30%), nhóm carbonyl thu được bao gồm andehit, xeton và este; nhóm triglycerid terpenoid thu được chiếm tỷ lệ từ 25-29 %, chủ yếu là nonacosanol.

Hòa tan các hydrocarbon thu được trong dung môi DE, sau đó tiến hành phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ với chương trình chạy 100°C-1-5 °C/phút cho đến 280°C, cột mao quản sắc ký HP-5MS chiều dài 30 m, đường kính bên trong cột 0,25 mm. Phổ MS của sản phẩm được so sánh với dữ liệu phổ NIST 0.5.L. và WILEY 275.L. Kết quả phân tích thành phần nhóm hydrocarbon được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Thành phần nhóm hydrocarbon trong terpenoid trung tính

Tên chất	% với tổng khối lượng hydrocarbon	
	Hoa đực	Hoa cái
Monoterpen		
α -Pinen	-	0,80
β -Pinen	-	1,20
3-carene	-	2,00
Mircen	-	1,30
β -phellandren	-	0,50
Sesquiterpen		
Germacren	4,28	5,10
β -elemen	0,27	0,37
α -cuben	7,04	6,70
ilangen	0,33	-
β -bourbonen	1,48	-
α -cobaen	0,81	+
B-cobaen	0,12	+
Longicyclen	0,03	-
Longifolen	0,76	1,00
Caryophyllen	11,34	10,15
α -murolen	4,07	3,05
γ -murolen	4,10	6,20

Tên chất	% với tổng khối lượng hydrocarbon	
	Hoa đực	Hoa cái
α -humulen	2,85	1,50
kadinen	0,61	1,10
γ -cadinen	0,43	1,00
δ - cadinen	7,67	7,00
Diterpen		
Sandarakopimaradien	2,13	4,50
Pamaradien	0,47	0,30
Isopimaradien	4,05	1,47
Dehydroabietadien	0,72	1,00
Abietadien	1,11	1,00
Neoabietadien	0,44	1,50
Triterpen		
squalen	1,67	1,00

Ghi chú: +: chất có hàm lượng dưới 0,1 %; - : không phát hiện

Từ bảng 4 có thể nhận thấy, không phát hiện nhóm chất monotерpen trong nhóm chất hydrocarbon ở hoa đực, ở hoa cái tuy có phát hiện nhưng hàm lượng không đáng kể với thành phần chủ yếu là pinen và caren. Trong thành phần của hydrocarbon, nhóm chất chiếm hàm lượng cao là các sesquiterpen, trong đó α -cuben, caryophyllen và δ - cadinen chiếm tỷ lệ cao nhất. Các diterpen có trong thành phần hydrocarbon gồm các terpen khung pimara và khung abieta trong đó sandarakopimaradien, isopimaradien và abietadien có hàm lượng cao nhất. Trong thành phần của triterpen ở cả hoa đực và hoa cái chỉ phát hiện hợp chất duy nhất là squalen.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được hàm lượng hoạt chất chiết được bằng dung môi PE trong hoa đực và hoa cái của cây thông Scots (*Pinus sylvestris*) tương ứng 10,5% và 14,2%. Trong đó, hàm lượng các terpenoid trung tính chiết, tách từ dịch chiết PE chiếm tỷ lệ 44,9% (hoa đực) và 37,5% (hoa cái) so với tổng khối lượng cao chiết PE. Hàm lượng nhóm hydrocarbon ở hoa đực và hoa cái là 1,48% và 2,8 % so với tổng khối lượng của terpenoid trung tính. Thành phần nhóm hydrocarbon thu được gồm có: monotерpen, diterpen, sesquiterpen và triterpen; trong đó ở hoa đực không phát hiện monotерpen; sesquiterpen chiếm tỷ lệ cao trong cả hoa đực và hoa cái với thành phần có hàm lượng cao nhất là caryophyllen. Trong nhóm hợp chất diterpen, sandarakopimaradien và isopimaradien chiếm tỷ lệ cao nhất. Triterpen ở hoa đực và hoa cái chỉ phát hiện squalen với hàm lượng không đáng kể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Бессчетнова Н.Н., Бессчетнов В.П., *Сосна обыкновенная (Pinus sylvestris) морфометрия и физиология хвои плюсовых деревьев*, Монография, Нижний Новгород, 2014, 369 с.
2. Солодкий. Ф. Т., *Научные труды по лесобиохимии*, Издательство Политехнического университета, СПб, 2013, 531 с.
3. Nguyễn Kim Phi Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 2007.
4. Колодынская Л.А., Разина Н.Ю., Рощин В.И., Соловьев В.А., *О различии в групповом составе экстрактивных веществ хвои и побегов сосны обыкновенной*, Химия древесины, 1984, **5**:74-78.
5. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А., *Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы*, М., 1991, 320 с.
6. Дао Н. М., Рощин В. И., *Групповой состав экстрактов из мужских генеративных микростробилов и женских генеративных побегов сосны обыкновенной*, Материалы V Всероссийской конференции с международным участием «Леса в России», 2016, с. 114.

Nhận bài ngày 10 tháng 10 năm 2022

Phản biện xong ngày 01 tháng 11 năm 2022

Hoàn thiện ngày 19 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Liên hệ: Đào Nguyên Mạnh

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: 0987877096; Email: daonguyenmanh0209@gmail.com